

Recenzja pracy doktorskiej mgr Wioletty Anny Białobrzeskiej

**pt.: „BADANIE KORELACJI MIĘDZY WŁAŚCIWOŚCIAMI
ELEKTROCHEMICZNYMI I SPEKTROSKOPOWYMI
WYBRANYCH POCHODNYCH 9,10-ANTRACHINONU,
A ICH AKTYWNOŚCIĄ BIOLOGICZNĄ ”**

Należąca do grupy antracyklin dokсорubicyna i jej pochodne, są jest aktywnym biologicznie metabolitem *Streptomyces peucetius ver. caesus*, używanym klinicznie jako efektywna cząsteczka przeciwnowotworowa w leczeniu chorób onkologicznych u dzieci i dorosłych. Kliniczne stosowanie antracyklin w opinii Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego uznało antracykliny za jeden z najważniejszych czynników ryzyka w patogenezie dysfunkcji mięśnia sercowego, występującej u ok. 10% leczonych.¹ Kardiomiopatia będąca skutkiem ubocznym stosowania antracyklin może przebiegać bezobjawowo ale może także manifestować się nawet ciężką niewydolnością mięśnia sercowego. Rokowanie w kardiomiopatii poantracyklinowej jest znacząco gorsze

¹ Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, Krumholz HM, Levy D, Mensah GA, Narula J, Shor ES, Young JB, Hong Y; Circulation. 2008 May 13;117(19):2544-65. doi: 10.1161

niż nawet w pozawałowej czy idiopatycznej.² Biorąc powyższe pod uwagę tematyka prezentowanej pracy doktorskiej Pani mgr Wioletty Anny Białobrzskiej wpisuje się w niezwykle palący problem z zakresu chemii medycznej antracyklin, biologii nowotworów i onkologii

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalną pracą doświadczalną poświęconą nowym aspektom korelacji parametrów elektrochemicznych, powinowactwem do DNA i kardiolipiny jako wybranych targetów biologicznych pochodnych 9,10-antrachinonu z aktywnością przeciwnowotworową wobec komórek pochodzenia ludzkiego. Godnym uwagi wydaje się być fakt iż oceniana dysertacja jest kontynuacją bardzo ciekawych badań prowadzonych przez Zespół Pana Promotora nad syntezą nowych chemioterapeutyków i mechanizmami ich biologicznej aktywności.

Rozprawa zawiera 164 strony tekstu, w tym 91 rycin, 22 tabele oraz 138 aktualnych pozycji piśmiennictwa. Struktura całości tekstu jest typowa dla rozpraw doktorskich. Obszerny wstęp rozprawy, nazwany częścią literaturową, poprzedzony jest wykazem używanych skrótów i symboli, spisem treści oraz zwięzłym wprowadzeniem.

Składa się z 6-ciu odrębnych podrozdziałów. Przedstawia rozległy stan wiedzy na temat pochodnych 9,10-antrachinonu w aspekcie budowy, właściwości biologicznych i farmakologicznych z uwzględnieniem kardiotoksyczności.

Kolejne rozdziały zapoczątkowuje, wprowadzenie teoretyczne, (właściwości antrachinonów, chemia wolnych rodników, struktura DNA i oddziaływanie z antracyklinami, rola kardiolipiny w powikłaniach stosowania antracyklin, a także uzasadnienie stosowanych metod fizykochemicznych (woltamperometria cykliczna [CV], różnicowa woltamperometria pulsowa [DPV], spektroskopia UV) oraz oceny cytotoksyczności *in vitro* na hodowlach komórkowych).

² N Engl J Med. 2000 Apr 13;342(15):1077-84. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. Felker GM1, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK.

Cel pracy zdefiniowany jest jako badanie korelacji pomiędzy właściwościami elektrochemicznymi i spektroskopowymi wybranych 11-tu pochodnych 9,10-antrachinonu, a ich aktywnością biologiczną.

Kolejny rozdział dysertacji to omówienie wyników i dyskusja, po której następuje podsumowanie i wnioski. Spis publikacji Doktorantki poprzedza obszerny wykaz literatury przedmiotu liczący 138 pozycji.

Rozprawę kończą streszczenia w językach polskim i angielskim.

Cel pracy wnosi istotne elementy nowości naukowej. Zrealizowany został jako badanie korelacji pomiędzy właściwościami elektrochemicznymi i spektroskopowymi wybranych pochodnych antrachinonów, w porównaniu do kontrolnych cząsteczek dokсорubicyny i bromku etydyny, a ich właściwościami biologicznymi *in vitro*.

Użyto licznych linii komórkowych, powszechnie znanych modeli nowotworowych ludzkich i mysich (MCF-7, MDA MB-231, 4T1, A549, UMUC-3)

Doktorantka badała pochodne piperazynowe i piperydynowe, kombinacje modyfikowane w pozycjach 1,4,5,8 pierścienia antrachinonu. Technika woltamperometrii cyklicznej oraz różnicowej woltamperometrii pulsowej uzyskano największą stałą oddziaływania z DNA $K_b=2,41 \times 10^5/M$ dla pochodnej 1-OH-8-ppz-AQ. Jest to wartość porównywalna z wartością otrzymaną dla dokсорubicyny. Uzyskany wynik Doktorantki jest w opinii recenzenta bardzo ciekawą wskazówką nad zastosowaniem tej pochodnej w leczeniu opornych na chemioterapię białaczek z uwagi na fakt iż kompleks antracykliny (daunorubicyny) z DNA tworzy nanostruktury nazwane „origami” penetrujące do komórek nowotworowych znacznie efektywniej niż wolna cząsteczka antrachinonu³. Stała oddziaływania dokсорubicyny z genomowym DNA $K_{b(\text{doxorubicyna})}=1,8 \times 10^6/M$ co świadczy o bardzo silnej interkalacji.

Warto zauważyć iż silna interkalacja 1-OH-8-ppz-AQ koreluje z jej efektywnością w stosunku do linii komórkowych. Recenzent z uznaniem ocenia próbę korelacji

³ Daunorubicin-Loaded DNA Origami Nanostructures Circumvent Drug Resistance Mechanisms in a Leukemia Model Patrick D. Halley, Dr. Christopher R. Lucas, Emily M. McWilliams, Matthew J. Webber, Randy A. Patton, Prof. Comert Kural, Prof. David M. Lucas, Prof. John C. Byrd, Prof. Carlos E. Castro Small. 2016 Jan 20; 12(3): 308–320. Published online 2015 Nov 19. doi: 10.1002/sml.201502118

efektywności *in vitro* z powinowactwem do kardiolipiny. Zauważono korelację między kardiotoxycznością, a zdolnością do tworzenia kompleksów antrachinonów z kardiolipiną.⁴

Znaczenie odkrycia Doktorantki pogłębia fakt publikacji z 2017, w której badano oddziaływanie Daunorubicyny z lecytiną i cholesterolem, z uwagi na fakt że cholesterol jest nieznaczącą komponentą wewnętrznej błony mitochondrialnej model kardiolipinowy wybranej interakcji zasługuje na duże uznanie jako najbardziej zbliżony do sytuacji komplikacji terapii – kardiomiopatii.⁵

Kolejną wskazówką pozwalającą recenzentowi na wyróżnienie wybranego przez Doktorantkę modelu kardiolipinowego jest publikacja zmian lipidogramu kardiolipiny związanego z remodellingiem tej cząsteczki związanym ze wzrostem przerzutowania.⁶

Model kardiolipinowy wiązania antracyklin implikuje lokalną generację stresu oksydacyjnego, który poprzez oksydacyjną modyfikację kardiolipiny generuje znaczący ubytek aktywności kompleksu 1-go łańcucha oddechowego mitochondriów.⁷

Pewien niedosyt recenzenta wywołuje brak eksperymentów asocjacji pochodnych antracyklinowych z jonami żelaza. W publikacji stwierdzono, rodzaj paradoksu biologicznego związanego z kardiomiopatią antracyklinową, polegający na selektywnej indukcji oksygenazy hemowej-I (HO-I) skutkującej akumulacją kardiotoxycznych jonów żelaza.⁸ Kolejną przesłanką wzmacniającą znaczenie kardiolipiny w regulacji stresu oksydacyjnego jest stwierdzony fakt fosforylacji cytochromu C w indukowaniu programowanej śmierci komórki.

⁴ Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies.

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijs HJ, Moens AL.

J Mol Cell Cardiol. 2012 Jun;52(6):1213-25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.006. Epub 2012 Mar 21. Review.

A biophysical approach to daunorubicin interaction with model membranes: relevance for the drug's biological activity. Alves AC, Ribeiro D, Horta M, Lima JLFC, Nunes C, Reis S.

J R Soc Interface. 2017 Aug;14(133). pii: 20170408. doi: 10.1098/rsif.2017.0408.

⁶ Cardiolipin composition correlates with prostate cancer cell proliferation.

Sapandowski A, Stope M, Evert K, Evert M, Zimmermann U, Peter D, Päge I, Burchardt M, Schild L.

Mol Cell Biochem. 2015 Dec;410(1-2):175-85. doi: 10.1007/s11010-015-2549-1. Epub 2015 Aug 28.

⁷ Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM.

Gene. 2002 Mar 6;286(1):135-41.

⁸ Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy.

Fang X, Wang H, Han D, et al.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Feb 12;116(7):2672-2680. doi: 10.1073/pnas.1821022116. Epub 2019 Jan 28.

Recenzent świadomy zainteresowań Promotora Doktorantki fosforanem pragnie zauważyć, iż fosfomimetyk cytochromu C wykazuje obniżoną aktywność indukowania apoptozy kardiomiocyta.⁹

Recenzent z uznaniem zauważa uzyskanie pozytywnej korelacji pomiędzy oddziaływaniem badanych antrachinonów z genomowym DNA i kardiolipiną, a efektywnością cytotoksyczną. Nowe pochodne zostały poddane badaniom na hodowlach komórkowych, w oparciu o testy przeżywalności MTT i SRB, które się uzupełniają i neutralizują swoje słabe punkty ze względu na różne „punkty uchwytu”.

Zastosowane metody statystyczne umożliwiły wiarygodną ocenę uzyskanych wyników.

Do przykrych obowiązków recenzenta należy analiza błędów i uchybień dysertacji. Na szczęście recenzent nie zauważył zbyt wielu przewinień. Na stronie 14-tej Dysertacji Doktorantka podaje „enzymatyczną aktywację kinaz **keratynowych**”.

Czy chodziło o kinazy **kreatynowe**?

Na tej samej stronie, włączyła cyklofosfamid do głównych antybiotyków antracyklinowych (tematu rozprawy), pomimo że kilka linijek wyżej właściwie określiła przynależność tego leku do grupy związków alkilujących.

Recenzent ma nadzieję na jednoznaczną korektę podanych wartości stałych asocjacji K_B na zgodną z obserwowaną i opisaną w tekście w stosunku do zamieszczonej w rycinie (s. 100-101). Ta wartość jest kluczowa dla wyciągniętych wniosków Rozprawy.

Powyższe uwagi odnośnie uchybień Dysertacji mają na celu ukierunkowanie dociekań Doktorantki na poszerzenie bazy wyników z zakresu oddziaływań antrachinonów z istotnymi biomolekułami.

⁹ Oxidative stress is tightly regulated by cytochrome c phosphorylation and respirasome factors in mitochondria. Guerra-Castellano A, Díaz-Quintana A, Pérez-Mejías G, et. Al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jul 31;115(31):7955-7960. doi: 10.1073/pnas.1806833115. Epub 2018 Jul 17.

Powyższe uchybienia rozprawy i uwagi recenzenta oraz literówki w niczym nie obniżają zasadniczej wartości recenzowanej pracy, która zawiera niekwestionowany element nowości naukowej. Praca napisana jest przystępnie co sprawiło iż czytałem ją z wielką przyjemnością. **W podsumowaniu chciałbym zaznaczyć i przedstawić mi do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Wioletty Anny Białobrzeskiej oceniam bardzo pozytywnie.** Doktorantka wykazała dużą dojrzałość w stawianiu pytań i poszukiwaniu na nie odpowiedzi, poprzez umiejętne zaplanowanie badań, zastosowanie odpowiednich metod, wnikliwą analizę wyników i ostrożną, właściwie prowadzoną dyskusję. Mając powyższe na uwadze stwierdzam, iż recenzowana praca spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym **proszę Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Wioletty Anny Białobrzeskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość pracy, bogaty dorobek publikacyjny, wnoszę o wyróżnienie nagrodą Rozprawy Doktorskiej.

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Katedra i Zakład Chemii Medycznej
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1
tel. (+48 58) 349 14 50
fax (+48 58) 349 14 56

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Medycznej

prof. dr hab. med. Michał Woźniak